

Übung 12 – Wiederholung/Zusatzübung

Inhalte:

- ➡ Mendelscher Erbgang
- ➡ Grundlegende Experimente der Molekulargenetik
- ➡ Transposons
- ➡ Methoden

1. Sie haben drei runde, gelbe Erbsen (A, B und C). Aus jeder der drei Erbsen entwickelt sich eine Pflanze. Alle drei Pflanzen wurden mit einer Pflanze gekreuzt, die aus einer grünen, schrumpfligen Erbse stammt. Exakt 100 Nachkommen der jeweiligen Kreuzung ergaben folgende Phänotypenklassen:

A: 51 gelb, rund
 49 grün, rund
B: 100 gelb, rund
C: 24 gelb, rund
 26 gelb, schrumpfig
 25 grün, rund
 25 grün, schrumpfig

Was waren die Genotypen von A, B und C? Leiten sie dazu Dominanzverhältnisse ab.

A: 51 gelb, rund
49 grün, rund
B: 100 gelb, rund
C: 24 gelb, rund
26 gelb, schrumpelig
25 grün, rund
25 grün, schrumpelig

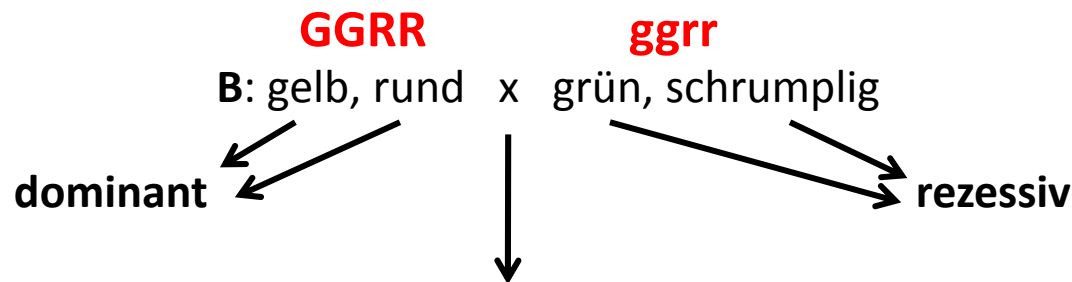
A, B und C alle mit derselben Pflanze gekreuzt
→ Unterschiede in der Nachkommenschaft
gehen auf Unterschiede in den Genotypen
von A, B und C zurück!

gelb, rund x grün, schrumpelig



Nachkommen

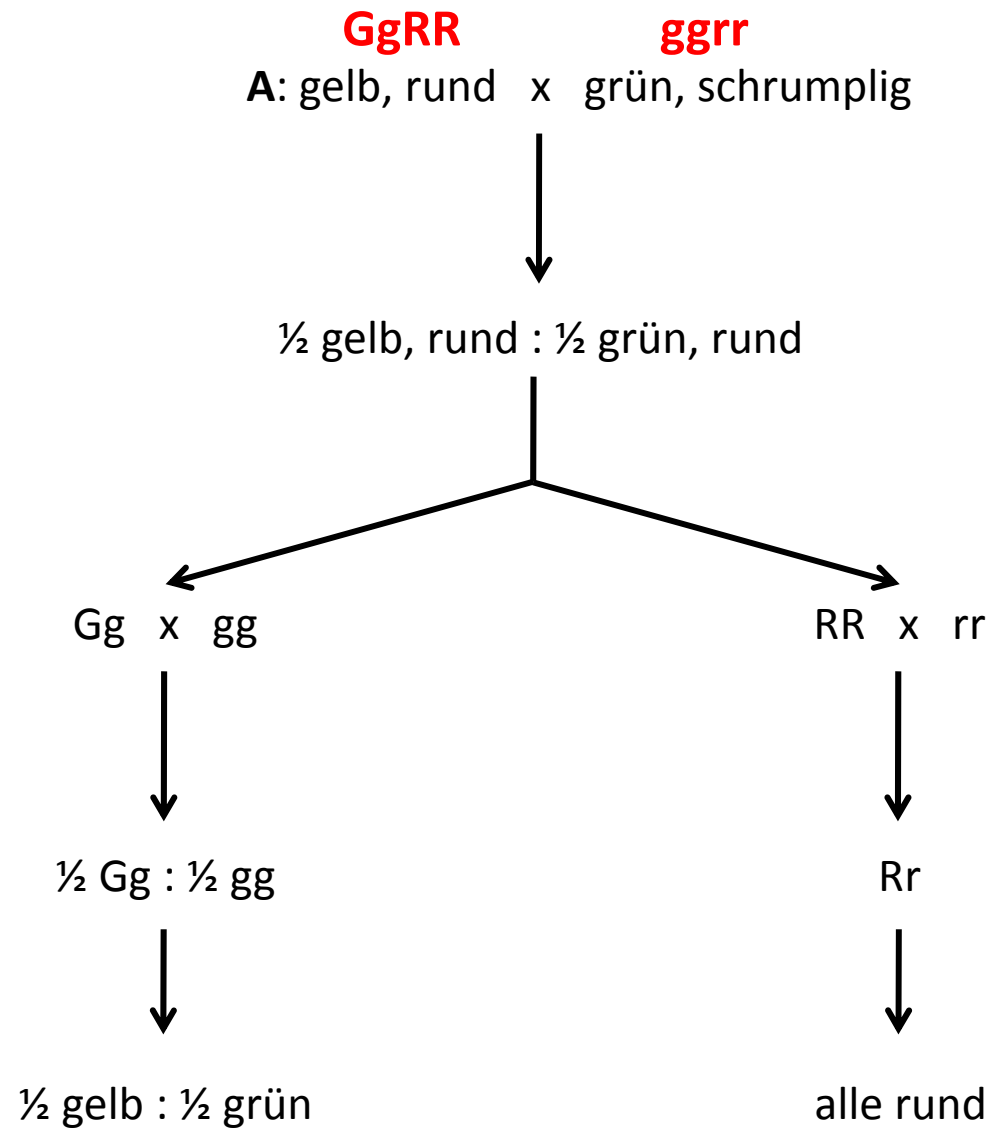
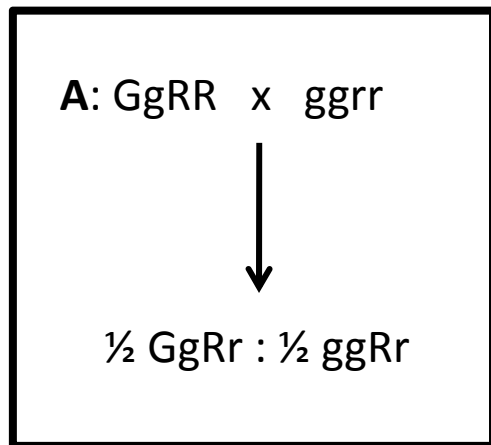
Dominanz?



→ alle Kreuzungen sind Testkreuzungen zur hom. rezessiven Linie

alle gelb, rund → gelb und rund müssen **dominant** sein

- A: 51 gelb, rund
49 grün, rund
- B: 100 gelb, rund
- C: 24 gelb, rund
26 gelb, schrumpelig
25 grün, rund
25 grün, schrumpelig



A: 51 gelb, rund
49 grün, rund
B: 100 gelb, rund
C: 24 gelb, rund
26 gelb, schrumpelig
25 grün, rund
25 grün, schrumpelig

50 gelb : 50 grün

→ 1 : 1

49 rund : 51 schrumpelig → 1 : 1

Beide Gene
müssen in C
heterozygot
vorliegen!

GgRr
C: gelb, rund x grün, schrumpelig



$\frac{1}{4}$ gelb, rund : $\frac{1}{4}$ gelb, schrumpelig : $\frac{1}{4}$ grün rund : $\frac{1}{4}$ grün schrumpelig

2. Erläutern Sie die Experimente von Griffith, Avery, Hershey und Chase.
Welche grundsätzlichen Erkenntnisse wurden dadurch gewonnen?

Kenntnisstand über DNA und Gene um 1920

→ ca. 30 Jahre vor Auflösung der DNA Struktur durch Watson und Crick 1953:

- Gene (die Mendelschen Erbfaktoren) wurden mit bestimmten Merkmalen assoziiert → aber ihre physikalische Natur war unbekannt
- Gene sind auf den Chromosomen
- Chromosomen bestehen aus DNA und Protein



**Gene aus DNA
oder Protein?**

Warum bestand viele Jahre eine solche Zurückhaltung die Rolle der DNA in der Vererbung anzuerkennen?

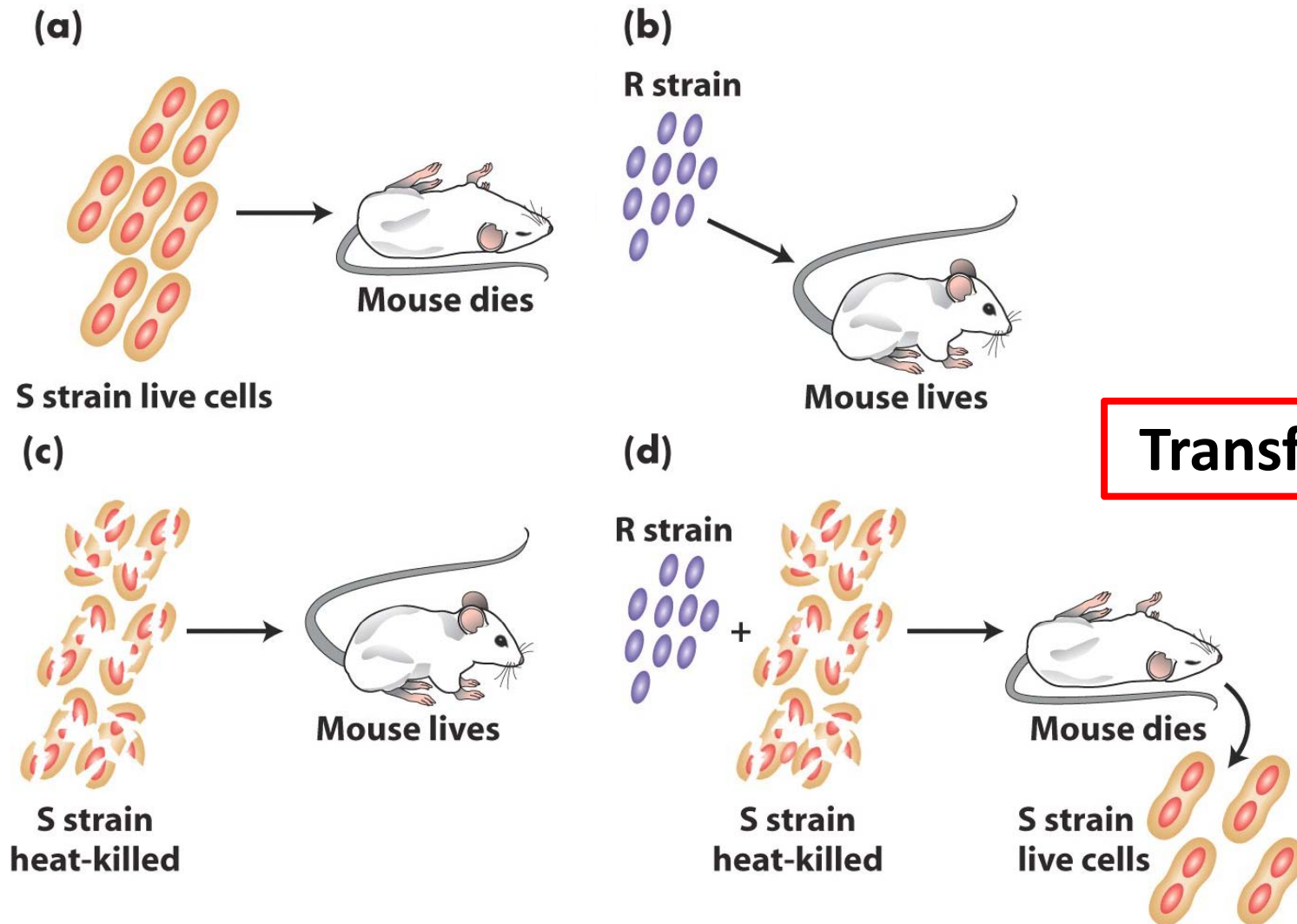
- chemisch gesehen ist DNA eher eine simple Struktur
- genetisches Material muss die Fähigkeit besitzen für spezifische Informationen zu codieren und diese Informationen präzise zu replizieren
- wie sollte ein solch einfaches Molekül so komplexe Funktionen erfüllen?

Frederick Griffith (1928):

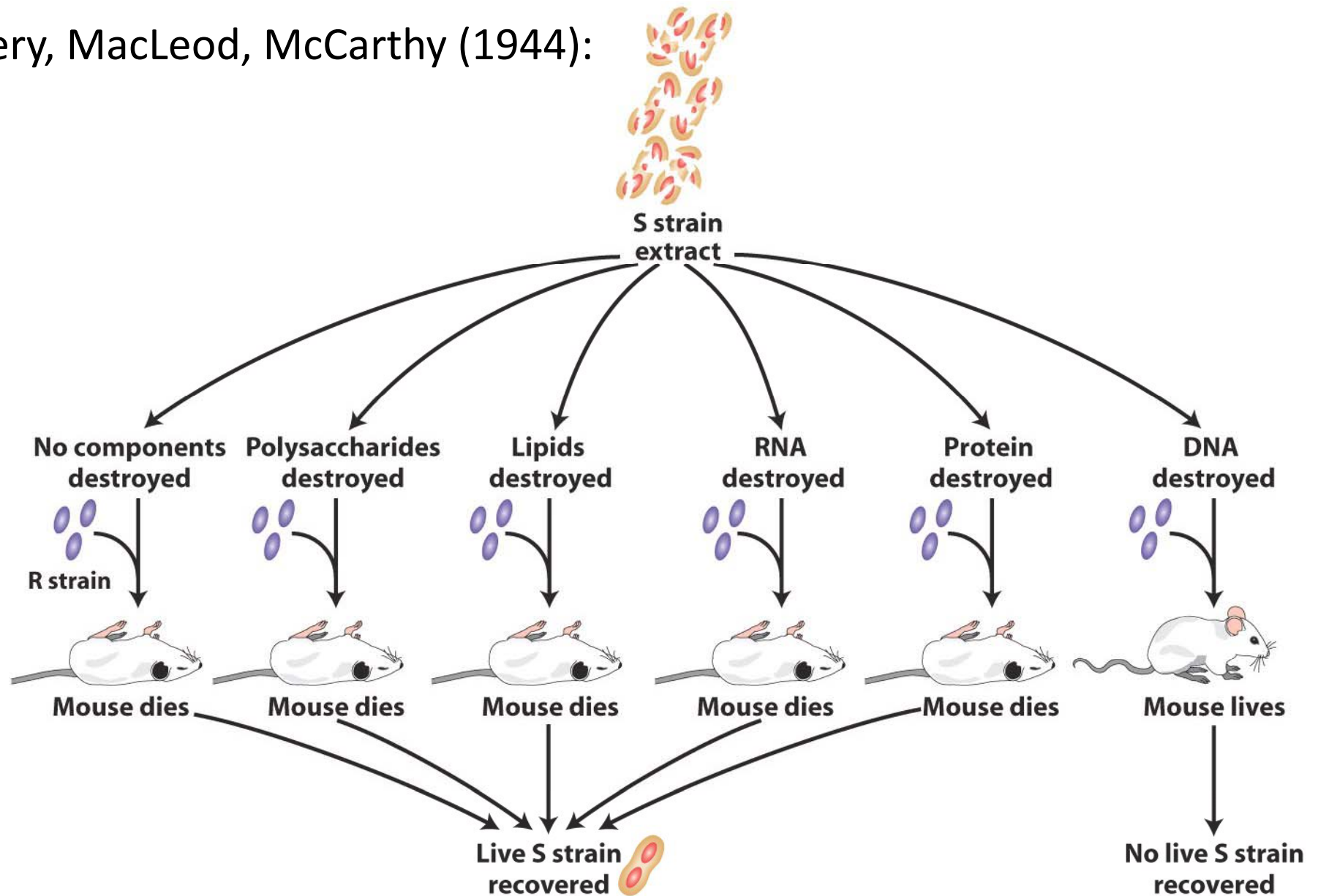
Streptococcus pneumoniae → Lungenentzündung (lethal bei Mäusen)

S-Stamm: glatte Kolonien durch Polysaccharidhülle → virulent

R-Stamm: rauhe Kolonien → keine Polysaccharidhülle → avirulent

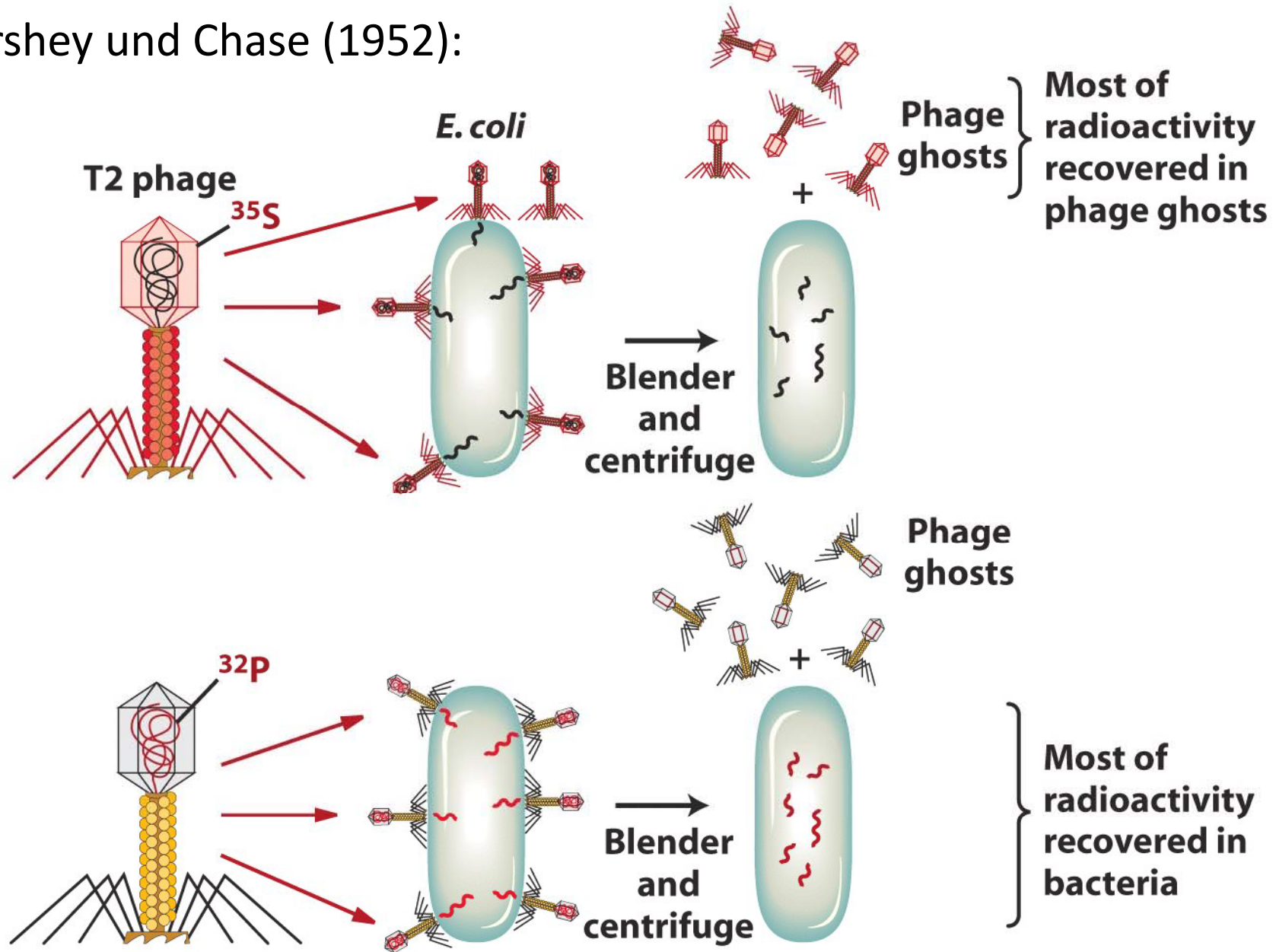


Avery, MacLeod, McCarthy (1944):



‘The Transforming Principle’ → DNA ist wahrscheinlich Träger der Gene!

Hershey und Chase (1952):



→ DNA ist Träger des Erbmateriels/der Gene!

3. Transposons:

a) Definieren Sie Transposons.

b) Erklären Sie die Funktion von Transposons am Beispiel von Barbara McClintocks *Ds* Elementen in Mais.

c) Was ist der Unterschied zwischen DNA Transposons und Retrotransposons?

d) Was für eine Funktion haben ‚Insertion Sequences‘ (IS-Elemente) in Prokaryoten?

Definition:

Ein **Transposon** (*umgangssprachlich: springendes Gen*) ist ein DNA-Abschnitt bestimmter Länge im Genom. Es umfasst ein oder mehrere Gene und hat die Möglichkeit seinen Ort im Genom zu verändern (Transposition).

Percentage of genome consisting of
interspersed repeats derived from
transposable elements

Organism	Percentage of Genome
Plant (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	10.5
Worm (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	6.5
Fly (<i>Drosophila melanogaster</i>)	3.1
Human (<i>Homo sapiens</i>)	44.4

3. Transposons:

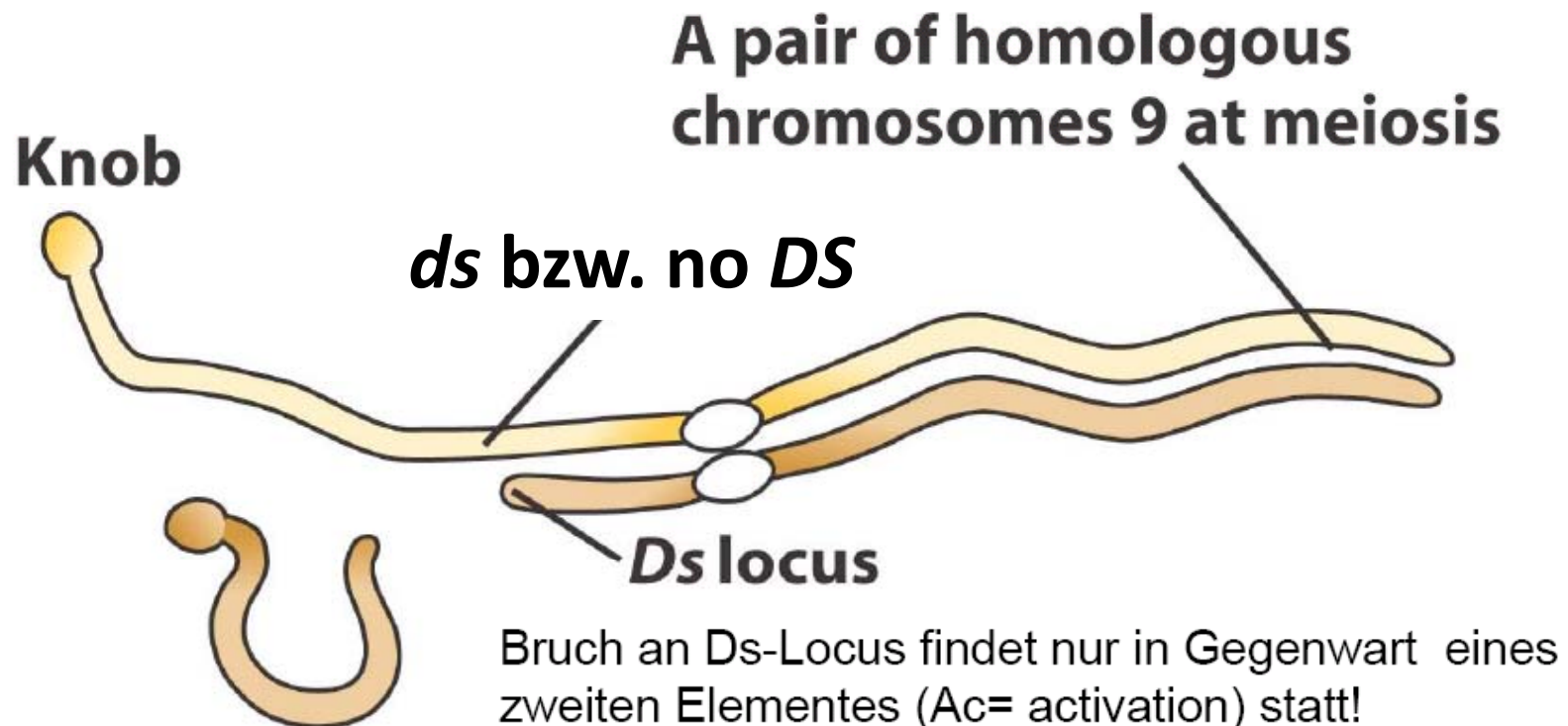
a) Definieren Sie Transposons.

b) Erklären Sie die Funktion von Transposons am Beispiel von Barbara McClintocks *Ds* Elementen in Mais.

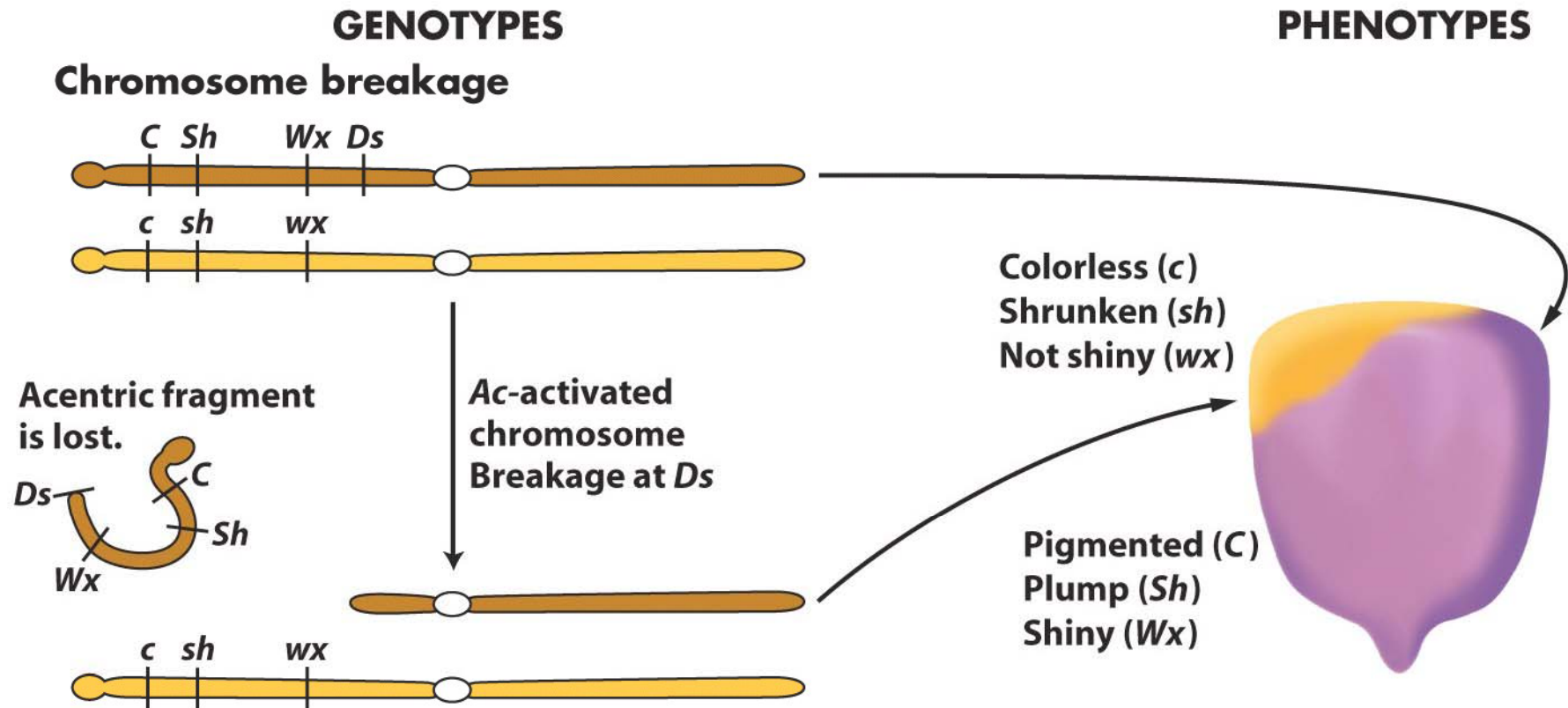
c) Was ist der Unterschied zwischen DNA Transposons und Retrotransposons?

d) Was für eine Funktion haben ‚Insertion Sequences‘ (IS-Elemente) in Prokaryoten?

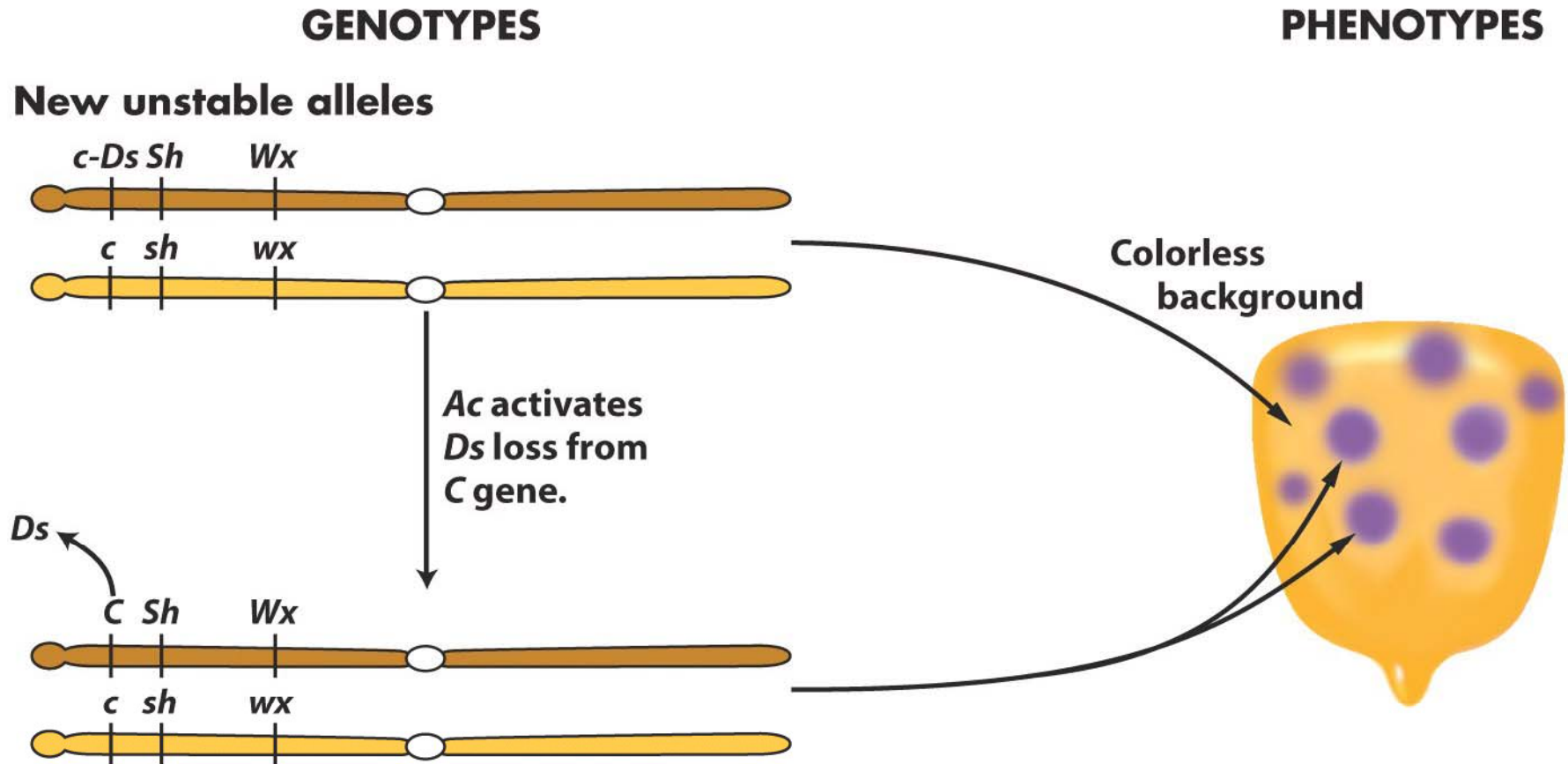
B. McClintock: in einer Mais-Linie häufig Chromosomenbrüche im Chromosom 9. Bruchpunkt: „dissociator“ (*Ds*)



Phänotypen Körnerpigmentierung (C Gen):



Seltene Phänotypen:



Phenotypes

Pigmented



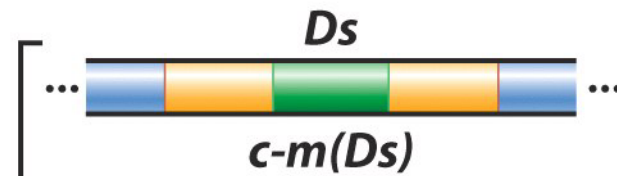
C gene
(wild type)



Colorless



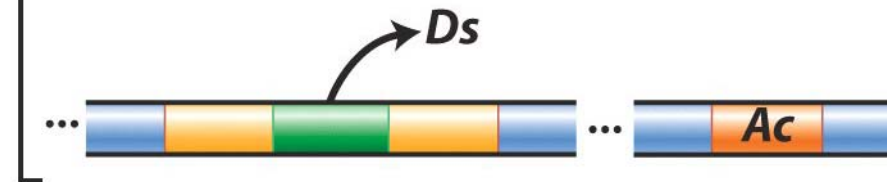
c-m(Ds)
(no *Ac*)



Spotted
kernels



c-m(Ds)
(+*Ac*)



3. Transposons:

a) Definieren Sie Transposons.

b) Erklären Sie die Funktion von Transposons am Beispiel von Barbara McClintocks *Ds* Elementen in Mais.

c) Was ist der Unterschied zwischen DNA Transposons und Retrotransposons?

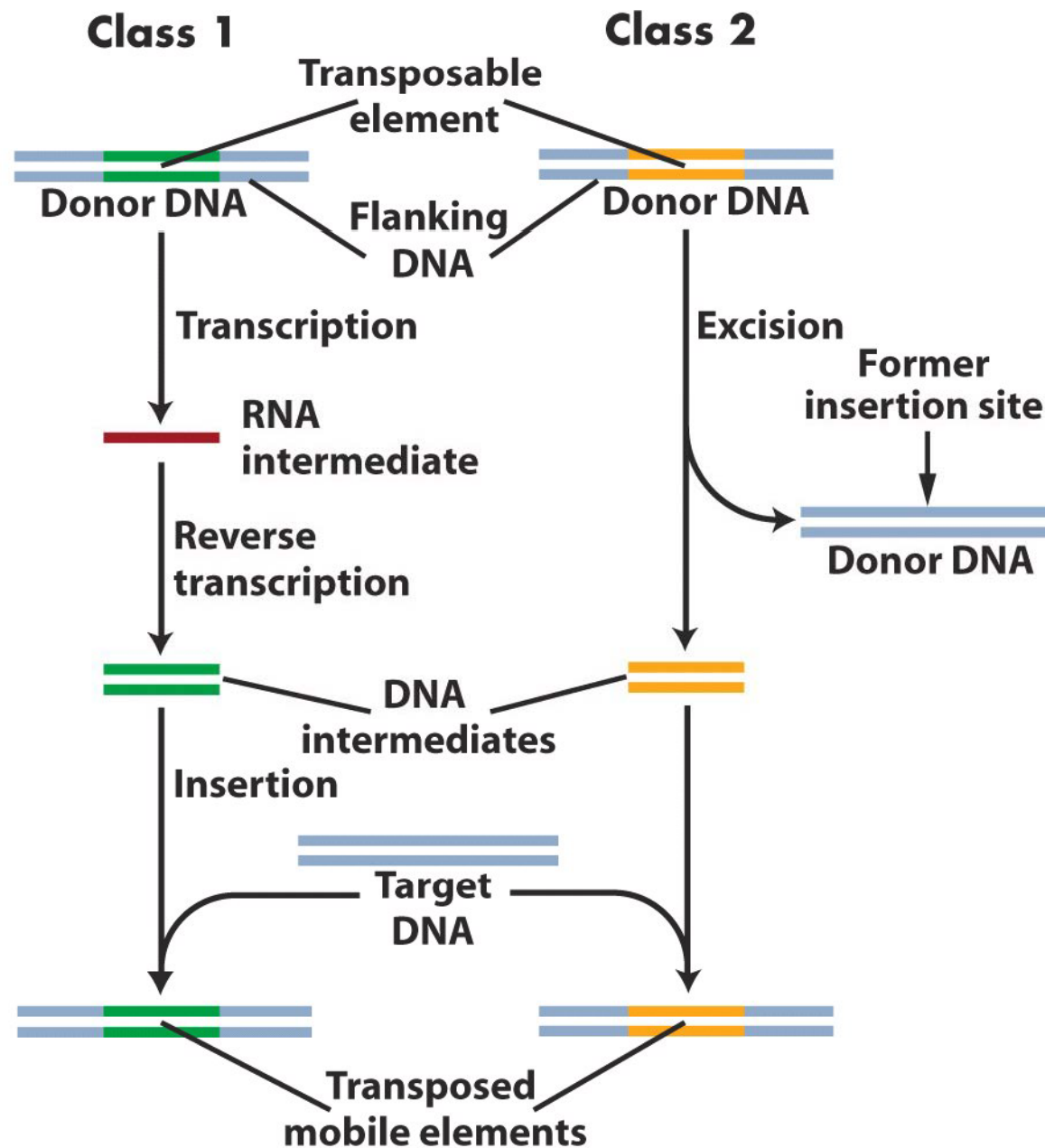
d) Was für eine Funktion haben ‚Insertion Sequences‘ (IS-Elemente) in Prokaryoten?

Definition Retrotransposons:

Transposons die über ein RNA-Intermediat mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase transponieren/translozieren.

Definition DNA Transposons:

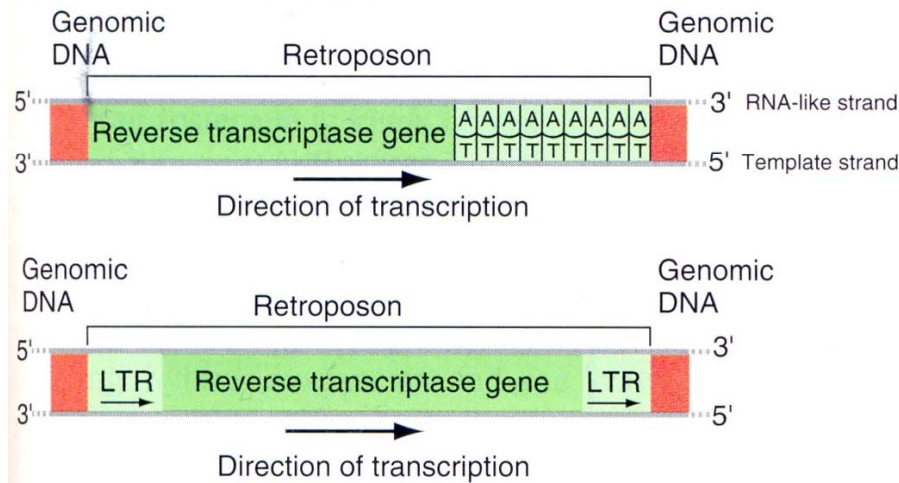
Transposons deren Transposition kein RNA Intermediat involviert. Sie transponieren i.d.R. durch `cut and paste´ Mechanismen mithilfe des Enzyms Transposase.



Definition Retrotransposons:

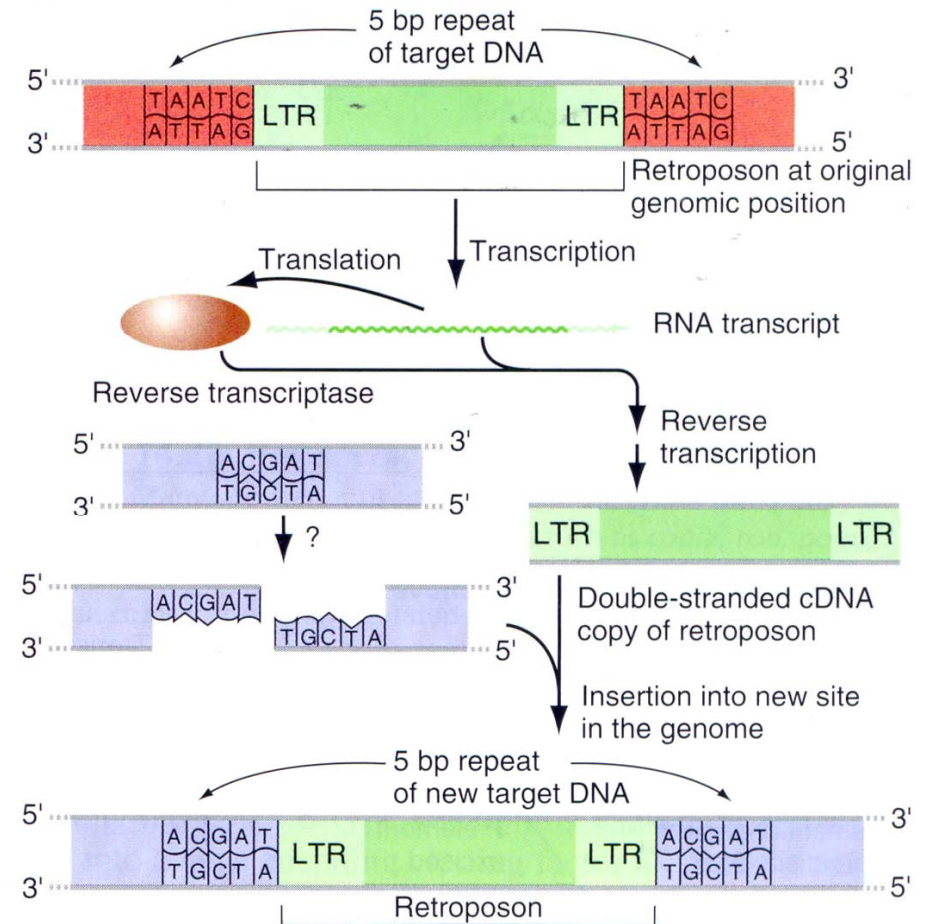
Transposons die über ein RNA-Intermediat mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase transponieren/translozieren.

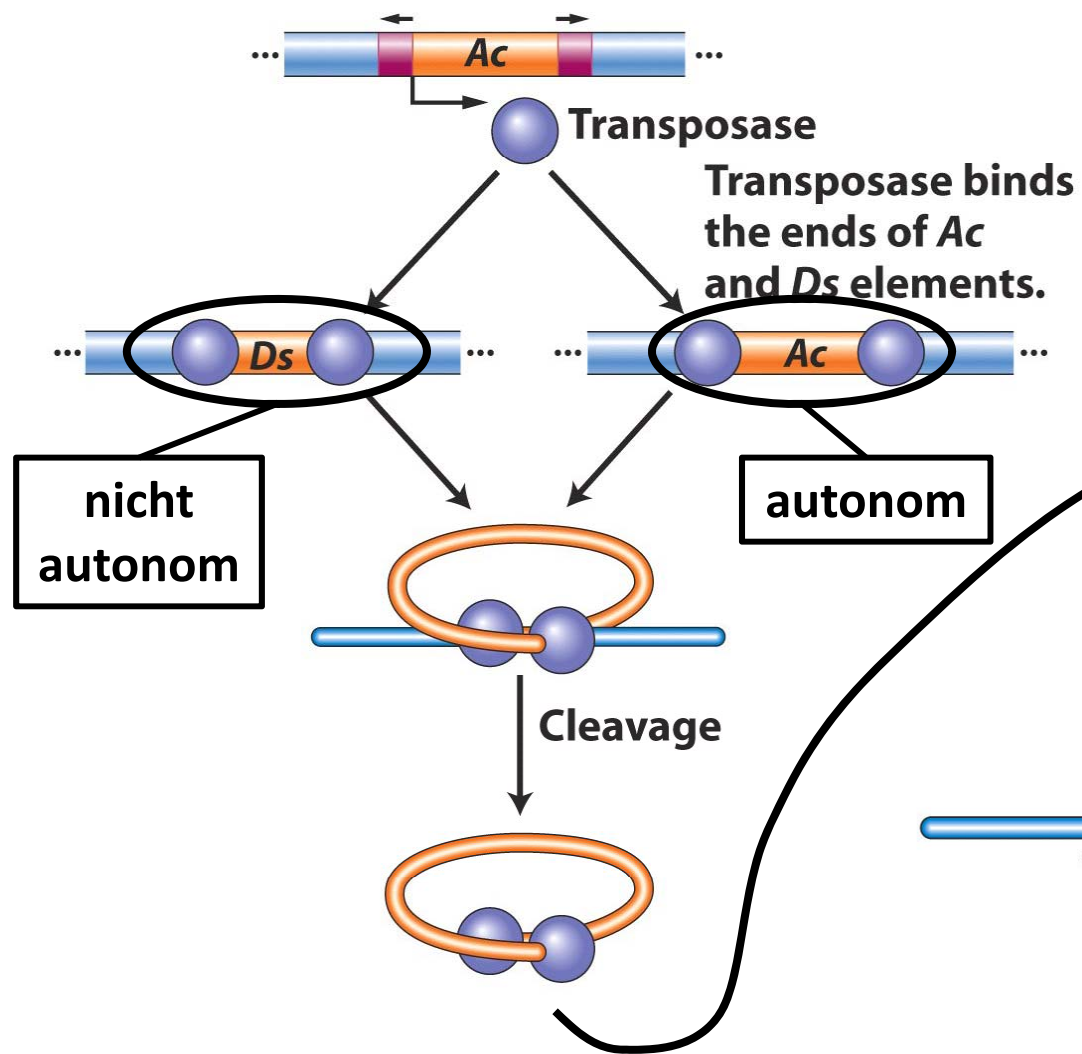
(a) Two kinds of retroposons



nur bei Eukaryoten!

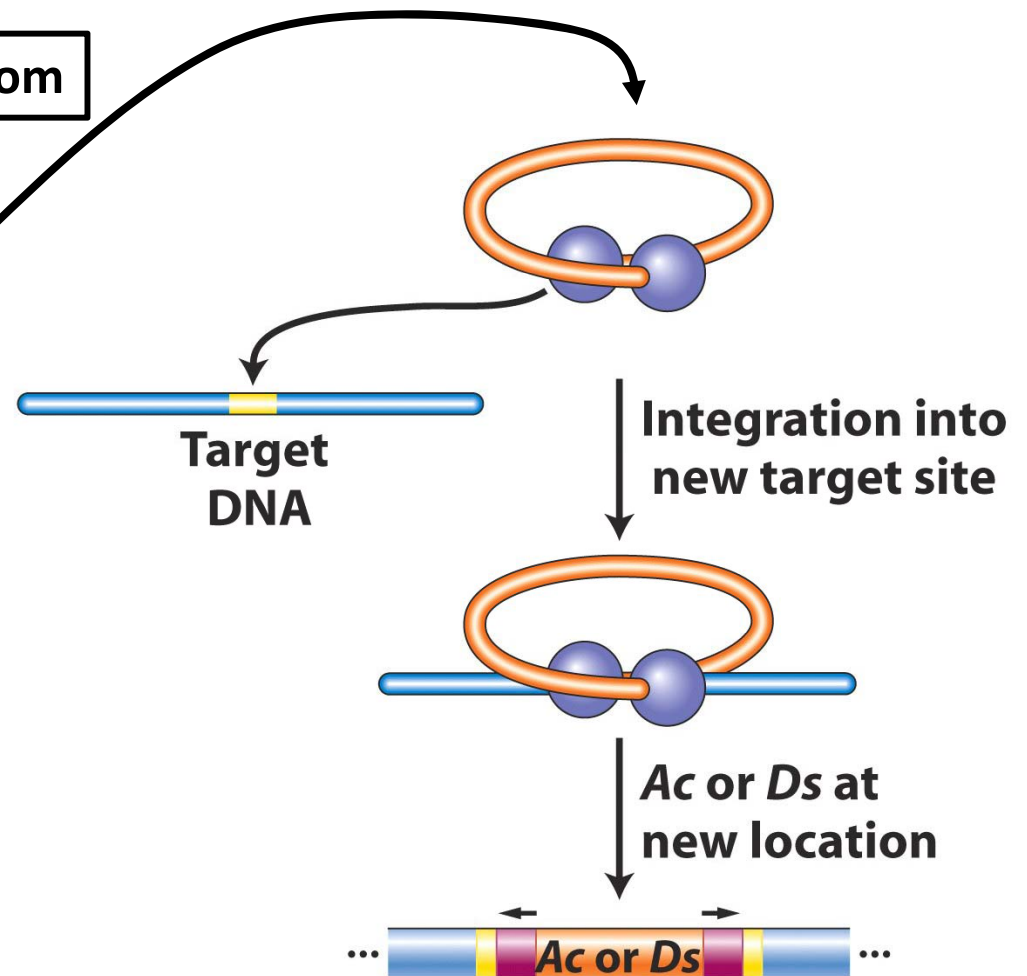
(c) How retroposons move





Definition DNA Transposons:

Transposons deren Transposition kein RNA Intermediat involviert. Sie transponieren i.d.R. durch 'cut and paste' Mechanismen mithilfe des Enzyms Transposase.



3. Transposons:

a) Definieren Sie Transposons.

b) Erklären Sie die Funktion von Transposons am Beispiel von Barbara McClintocks *Ds* Elementen in Mais.

c) Was ist der Unterschied zwischen DNA Transposons und Retrotransposons?

d) Was für eine Funktion haben ‚Insertion Sequences‘ (IS-Elemente) in Prokaryoten?

Definition:

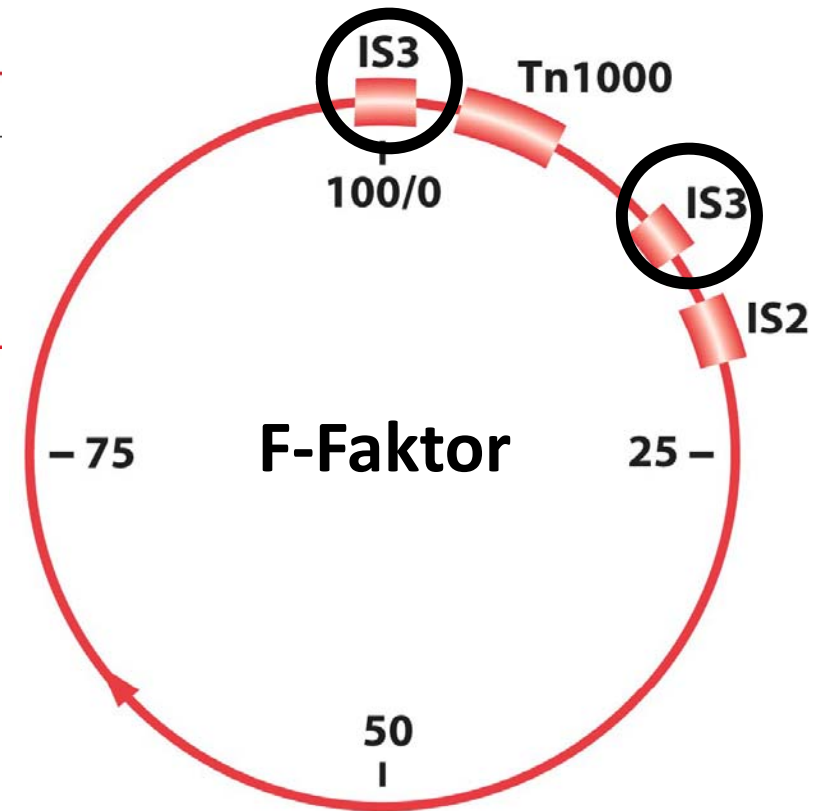
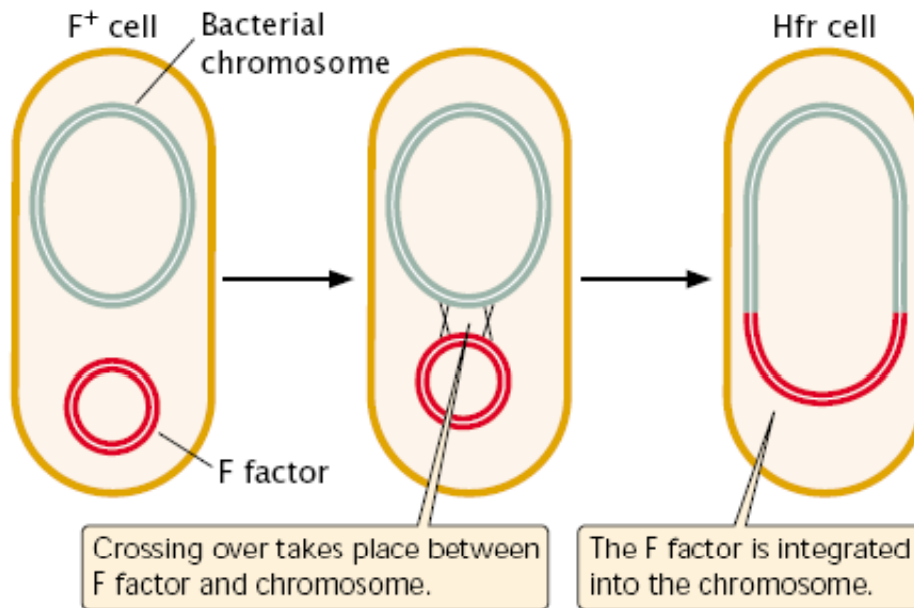
IS-Elemente sind Segmente bakterieller DNA, die ihre Position auf dem Chromosom verändern können bzw. sich in ein anderes Chromosom inserieren können.

Table 13-1 Prokaryotic Insertion Elements

Insertion sequence	Normal occurrence in <i>E. coli</i>	Length (bp)
IS1	5–8 copies on chromosome	768
IS2	5 copies on chromosome; 1 copy on F	1327
IS3	5 copies on chromosome; 2 copies on F	1400
IS4	1 or 2 copies on chromosome	1400
IS5	Unknown	1250

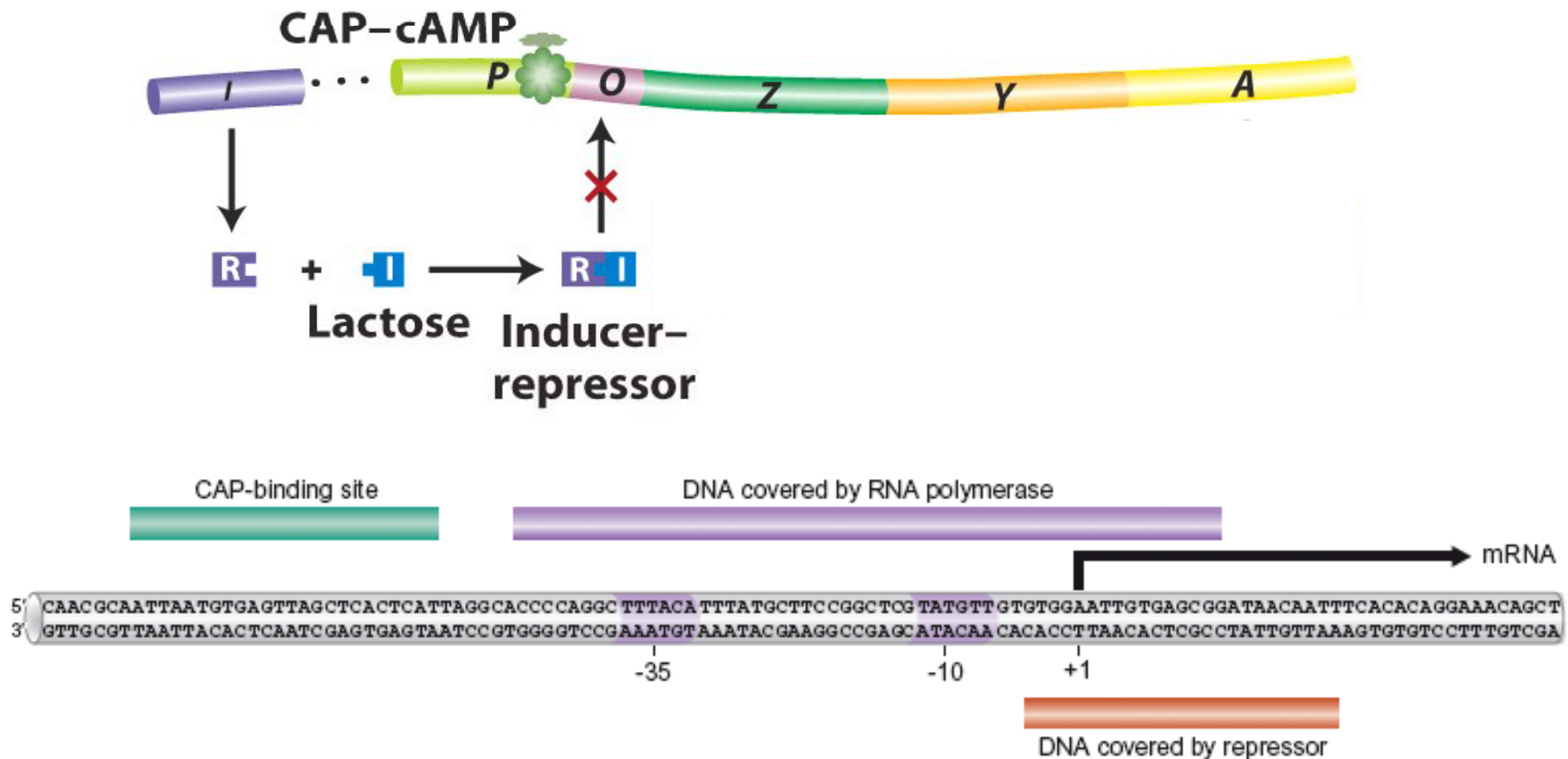
Table 13-1 Prokaryotic Insertion Elements

Insertion sequence	Normal occurrence in <i>E. coli</i>	Length (bp)
IS1	5–8 copies on chromosome	768
IS2	5 copies on chromosome; 1 copy on F	1327
IS3	5 copies on chromosome; 2 copies on F	1400
IS4	1 or 2 copies on chromosome	1400
IS5	Unknown	1250



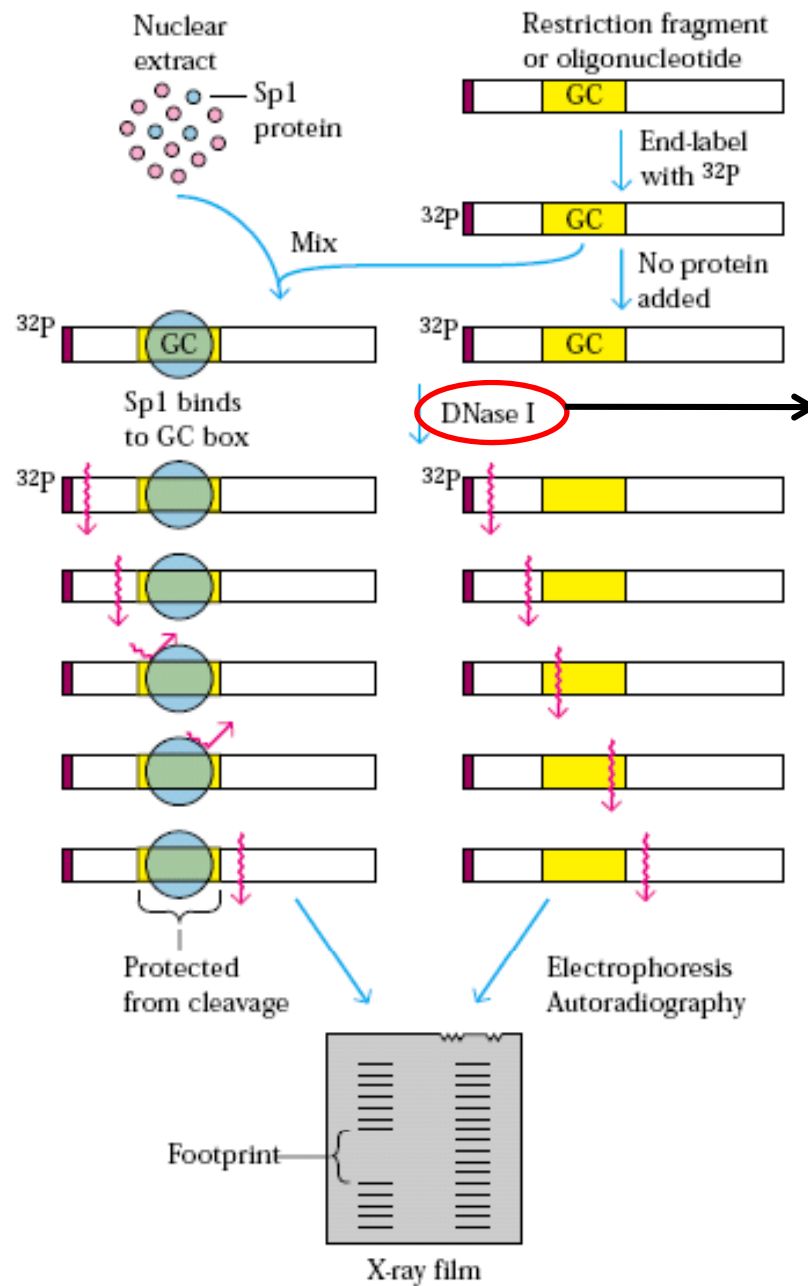
Funktion (u.a.) → Integration von F-Faktoren ins Bakterienchromosom

4. Sie analysieren die Regulation eines Operons. In diesem Zusammenhang haben Sie einen potentiellen Repressor identifiziert. Erklären Sie wie man mit Hilfe von ‚DNAse I Footprinting‘ die Operatorsequenz bestimmen kann. Welche Funktion hat DNAse I bei dieser Methode?

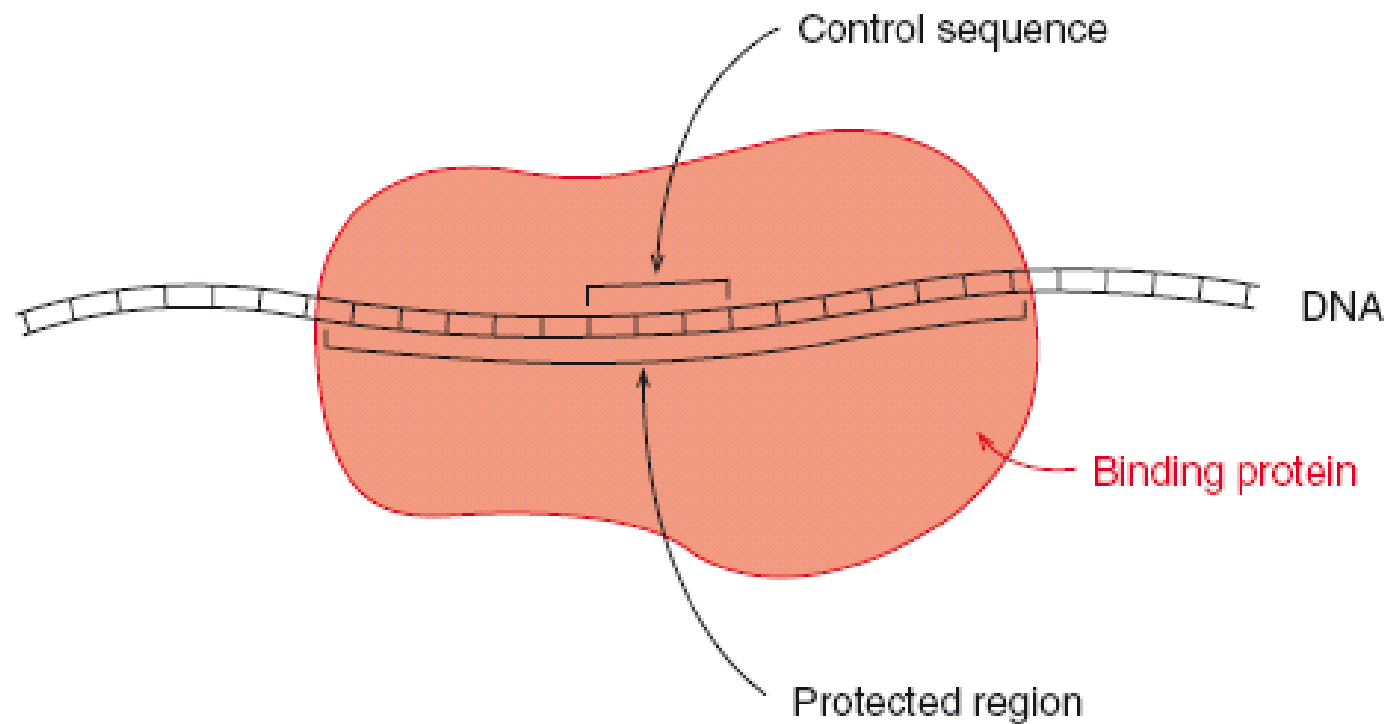
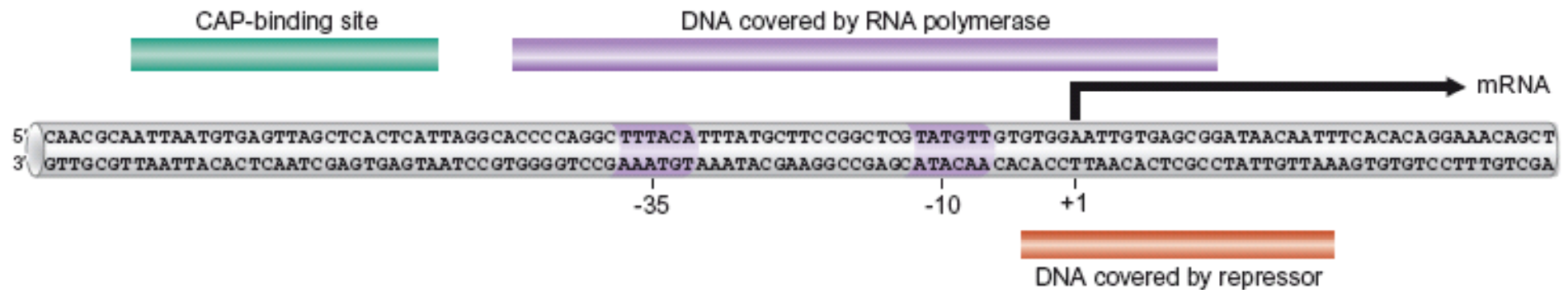


Wie kann man eine Proteinbindungsstelle auf der DNA identifizieren?

(a) DNA footprinting



schneidet i.d.R. Phosphodiesterbdg.
neben Pyrimidinnukleotiden



Aber: vom Protein geschützte DNA Region i.d.R. größer als Erkennungssequenz!

5. Definieren Sie den Begriff ‚Reporter-gen‘ bzw. ‚Reporterprotein‘. Welche Eigenschaften sollte ein gutes Reportersystem haben? Erklären Sie den Unterschied von transkriptioneller und translationaler Fusion. Mit welcher dieser Fusionen analysieren Sie Proteine bzw. Promotoren? Welche Reporter kennen Sie?

Definition:

Ein Reporter-gen (-protein) ist ein Gen (Protein) mit einem relativ leicht messbaren Phänotyp, der sich deutlich von Hintergrundsignalen abhebt.

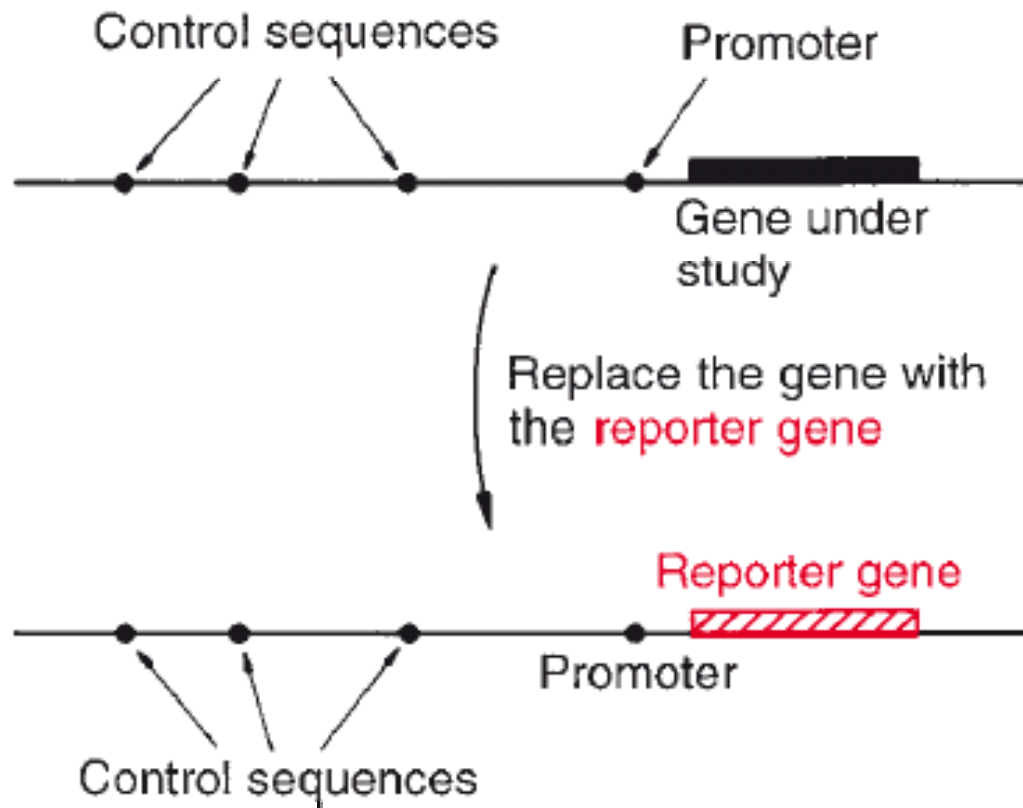
Eigenschaften:

- Hohe Sensitivität
- Geringe endogene Aktivität (Hintergrundsignal)
- Qualitative und quantitative Erfassbarkeit
- Möglichst weiter (linearer) Messbereich
- Hohe Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit
- Leichte Durchführbarkeit

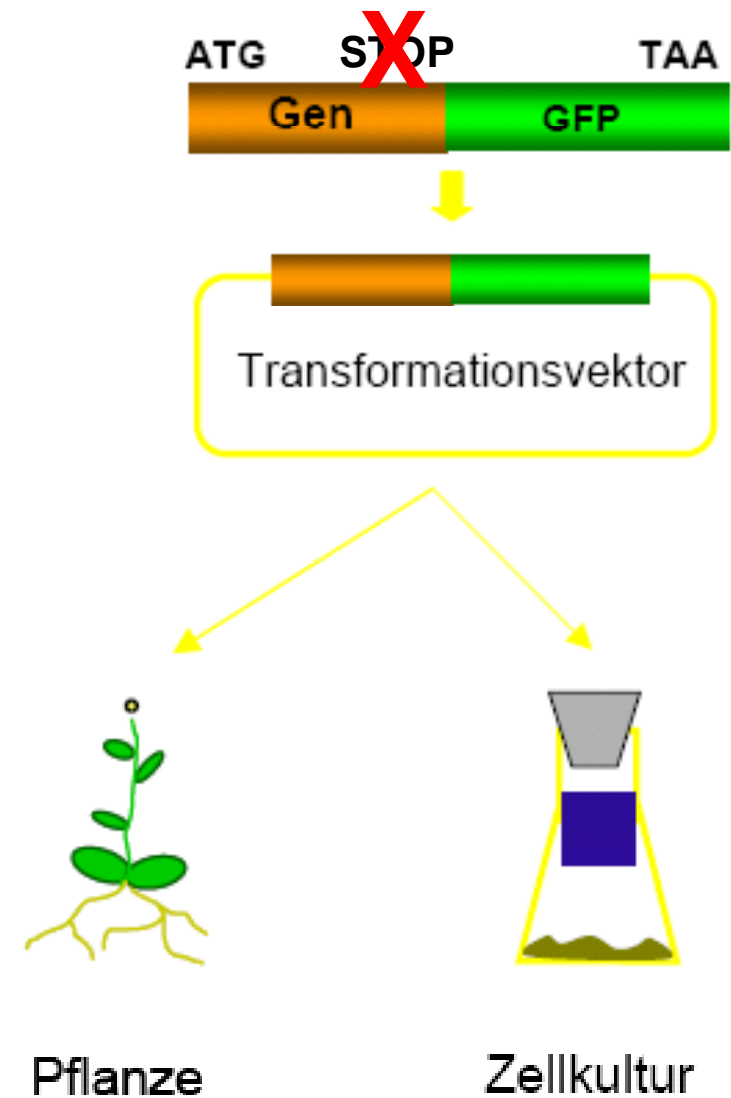
Nachweis erfolgt:

- radioaktiv
- mittels Resistenz
- mittels Farbreaktion
- chemi- oder biolumineszent
- fluoreszent

Transkriptionelle Fusion

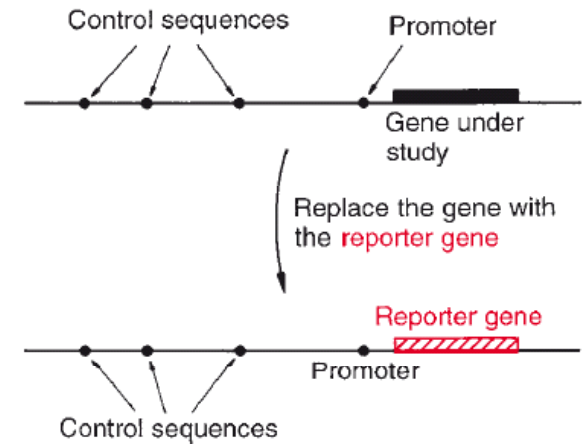


Translationelle Fusion

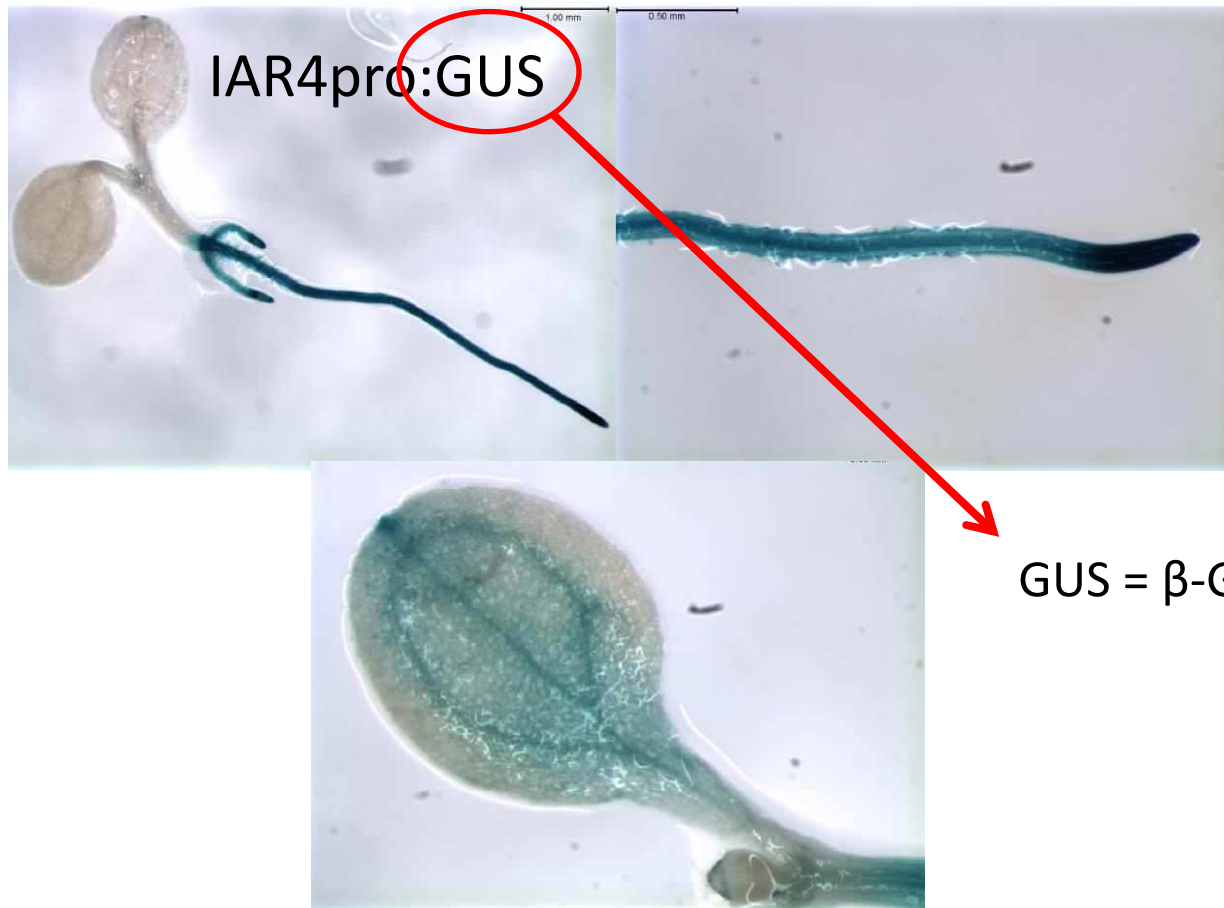


Transkriptionelle Fusion:

- dokumentiert die örtliche Aktivität des jeweiligen Promotors im analysierten Entwicklungsstadium



Arabidopsis thaliana



GUS = β -Glucuronidase

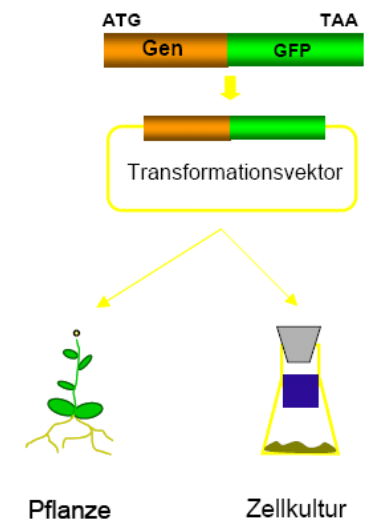
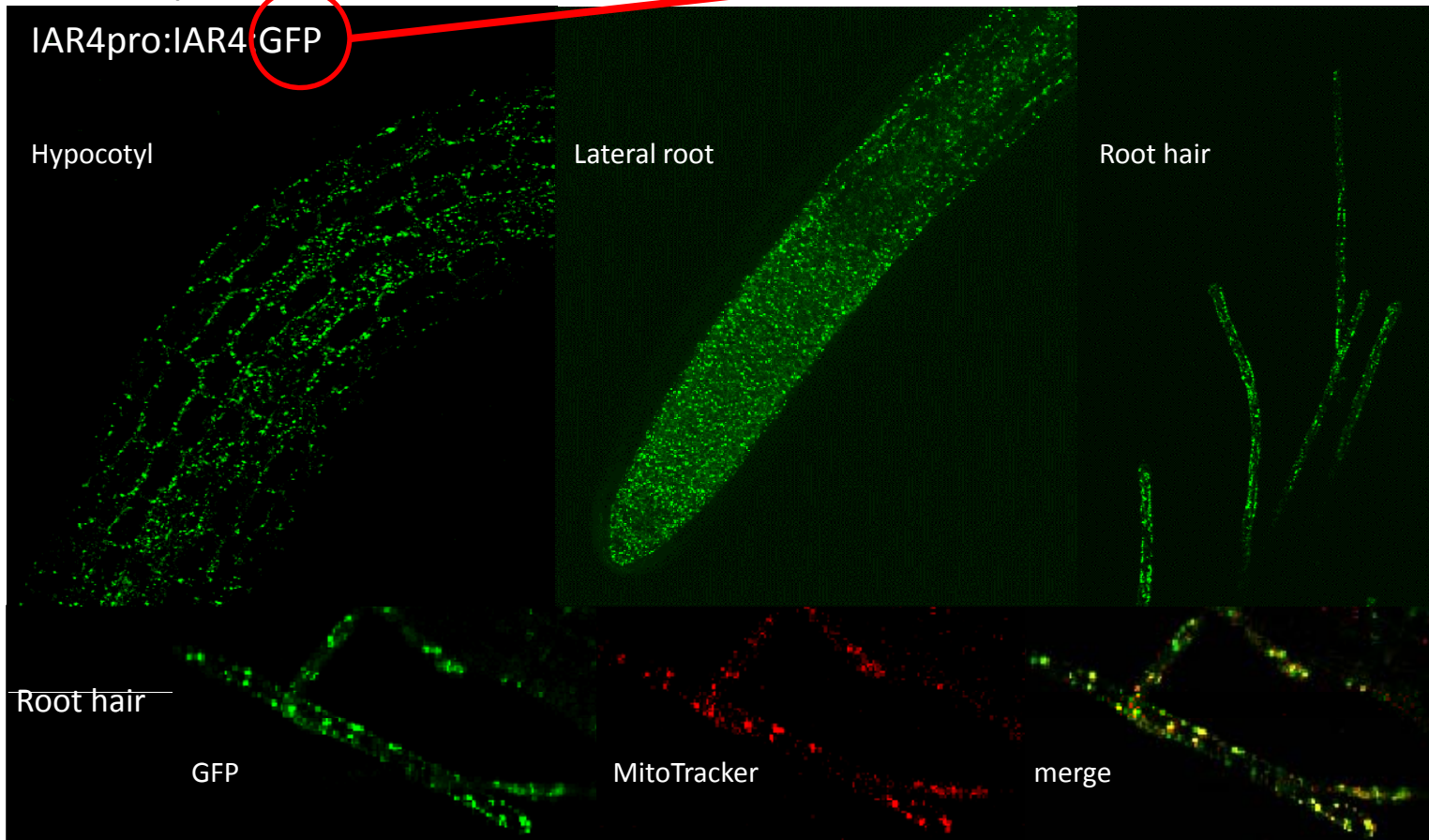
Translationelle Fusion:

- Dokumentiert die örtliche Lokalisation des jeweiligen Proteins im analysierten Entwicklungszustand

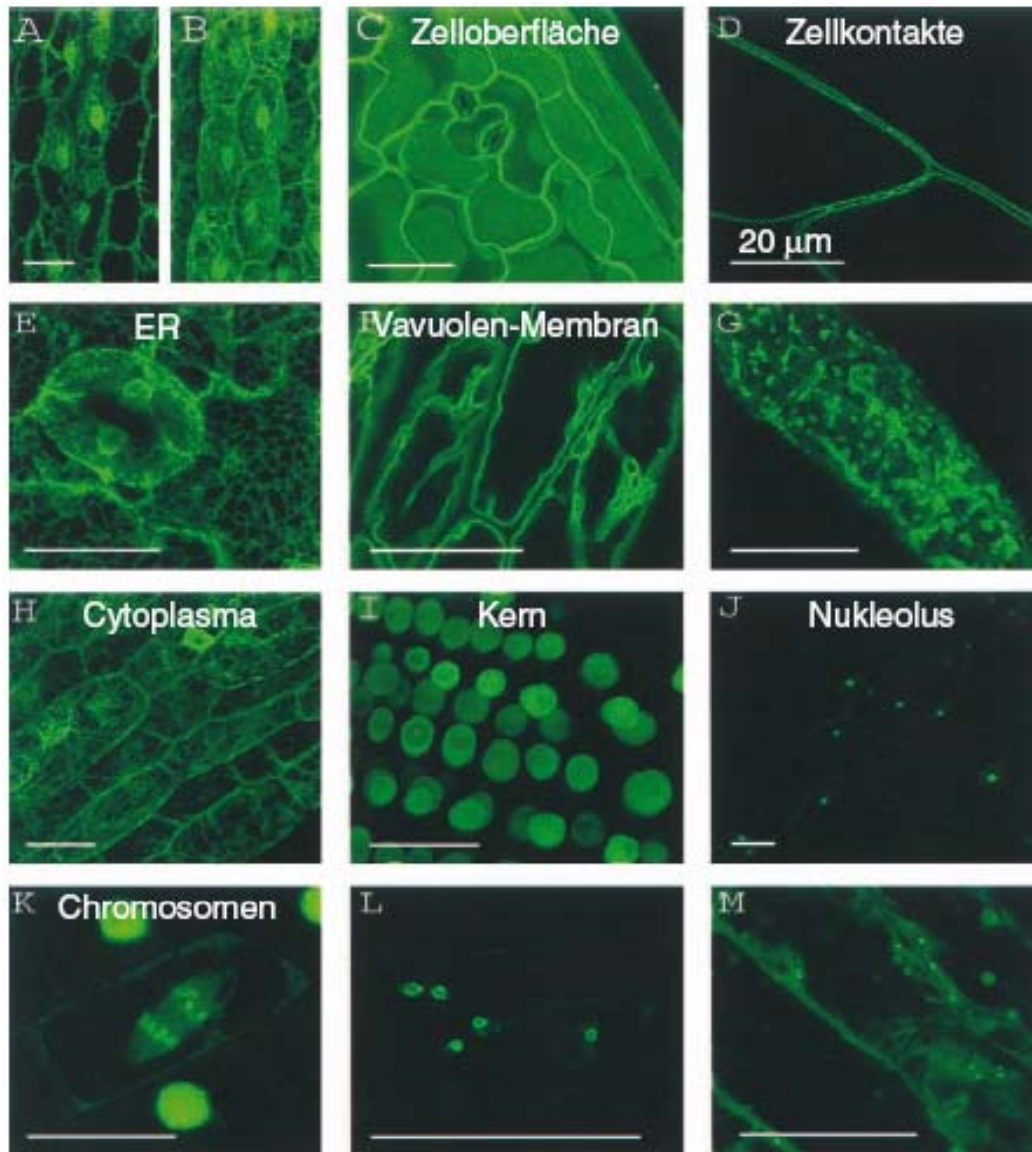


Arabidopsis thaliana

GFP = Green Fluorescent Protein

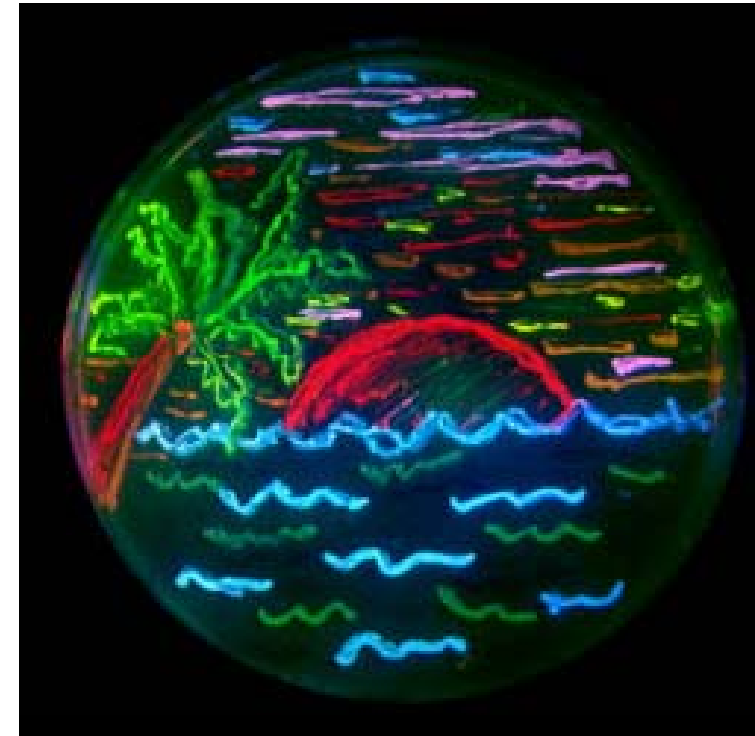


Weitere kompartimentspezifische translationelle GFP-Fusionen:



Outler *et al.* (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3718

8 verschiedene fluoreszierende Proteine in Bakterien:



Nathan Shaner, Paul Steinbach, Roger Tsien (2006)